

鲁海菊,谢欣悦,陶宏征,等. 内生木霉 P3.9 菌株在枇杷根际土壤中的定殖能力测定[J]. 江苏农业科学,2020,48(5):263-267.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.05.052

内生木霉 P3.9 菌株在枇杷根际土壤中的定殖能力测定

鲁海菊, 谢欣悦, 陶宏征, 沈云玫, 王 栋

(红河学院生命科学与技术学院, 云南蒙自 661199)

摘要:采用土壤稀释分离法与平板计数法测定内生木霉 P3.9 菌株在枇杷根际土壤中的种群密度,跟踪测试 90 d 内其在枇杷根际土壤中的定殖动态,结果表明,P3.9 菌株在枇杷根际土壤中的定殖过程大致可划分为 3 个阶段,前 25 d 内,菌株相对含量以 10 d 为 1 个周期呈增减增减变化趋势,且在 10 d 时达到最大值,为 9.52×10^5 CFU/g,该时期木霉 P3.9 菌株在根际土壤中快速适应并定殖存活;25~65 d 期间,P3.9 菌株相对含量的变化周期延长至 20 d,也呈增减增减变化趋势,且波动幅度较 5~25 d 期间小,该时期木霉能够相对稳定地定殖存活于根际土壤中;65~90 d 期间,P3.9 菌株相对含量在 65~75 d 期间出现小幅度增加后呈近直线状下降态势;5~75 d 期间,P3.9 菌株相对含量维持在 10^5 CFU/g 水平上,且 75 d 时较接种量只下降 1 个数量级,说明木霉 P3.9 菌株在枇杷根际土壤中的持效期可达 75 d。

关键词:生防菌;内生木霉;定殖能力;根际土壤;枇杷;种群密度法;持效期

中图分类号: S436.67⁺9;S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)05-0263-05

近代以来,随着化学农药的广泛使用,化学农药对生态环境、食品安全、人体健康等方面的负面影响越发引起人们的重视,而有关生防菌的研发与

应用也逐渐成为关注的热点。目前,在所有生防菌制剂中,木霉属(*Trichoderma*)真菌制剂产品约占 60%^[1]。木霉属真菌在自然界中分布广泛,是土壤微生物群落结构的重要组成部分,其菌丝生长与孢子萌发对温度、湿度、pH 值等适应范围广,且腐生能力强,生长繁殖速度快,可迅速利用营养、占据空间^[2-3],能防治多种植物的土传病害。自 1932 年 Weindling 发现木霉以来^[4],人们对其开展了大量研

收稿日期:2019-02-15

基金项目:国家自然科学基金(编号:31660147);云南省应用基础研究计划(编号:2016FB066);红河学院应用型科学研究重点项目(编号:XJY15Z06)。

作者简介:鲁海菊(1978—),女,云南大理人,博士,教授,从事植物病理学研究。E-mail:luhaiju2011@126.com。

[2] 姬飞腾,李楠,邓馨. 喀斯特地区植物钙含量特征与高钙适应方式分析[J]. 植物生态学报,2009,33(5):926-935.

[3] 周昌琴. 高钙废水生物处理过程中微生物群落及其生物酶的变化[D]. 兰州:兰州理工大学,2016.

[4] 何静旻,李绪忠. 碳酸钡去除综合冶炼废水中 Ca^{2+} 和 SO_4^{2-} [J]. 湖南有色金属,2017,33(2):56-60.

[5] 何静旻. 化学沉淀法除冶炼综合废水中 Ca^{2+} 和 SO_4^{2-} 的试验研究[D]. 长沙:湖南大学,2012.

[6] 曲超,郭继民,李志鹏. CO_2 沉淀法除冶炼综合废水中 Ca^{2+} 的试验研究[J]. 科技展望,2015,25(28):40-41.

[7] 黎新,孙长顺,赵建军,等. 分步沉淀法去除稀土废水中钙镁的研究[J]. 水处理技术,2016,42(7):88-92.

[8] 罗立,孔秀琴. 活性污泥法处理高氯高钙高 COD 废水的实验研究[J]. 工业水处理,2011,31(11):74-77.

[9] 秦承欢. 海水中钙离子吸附特征研究[D]. 大连:大连理工大学,2009.

[10] 石玉. 浓水中总硬度及钙镁离子的去除实验研究[D]. 太

原:太原理工大学,2013.

[11] 张振满,吴勇. 高钙高盐废水资源化工工艺研究[J]. 煤炭加工与综合利用,2017(12):64-67.

[12] 张兴儒,赵启文,师存杰,等. DK 纳滤膜处理高钙废水试验研究[J]. 工业水处理,2012,32(7):49-52.

[13] 王国胜,房安娜,贾南,等. 马-丙共聚物去除碳化硼用硼酸中钙离子的研究[J]. 无机盐工业,2017,49(6):66-68,72.

[14] Lee S W, Kim Y J, Lee Y H, et al. Behavior and characteristics of amorphous calcium carbonate and calcite using CaCO_3 film synthesis [J]. Materials & Design, 2016, 112: 367-373.

[15] Blue C R, Giuffre A, Mergelsberg S, et al. Chemical and physical controls on the transformation of amorphous calcium carbonate into crystalline CaCO_3 polymorphs [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2017, 196: 179-196.

[16] Tsuchiya Y, Wada Y, Hiaki T, et al. Effects of CO_2 fine bubble injection on reactive crystallization of dolomite from concentrated brine [J]. Journal of Crystal Growth, 2017, 469: 36-41.

究,并分离得到多种木霉,而在众多种类中,绿色木霉、哈茨木霉对植物病害表现出较好的防治效果^[5]。

木霉菌的成功定殖是其发挥防治作用的基本前提,且防治效果也部分取决于其存活定殖能力^[6]。有关木霉在土壤中定殖能力的研究已有相关报道,杜婵娟等结合时间因子,探究了木霉在土壤空间的定殖规律^[7];肖荣凤等跟踪分析了对茄科尖孢镰刀菌有拮抗作用的哈茨木霉在土壤中的存活与定殖能力^[8];古丽君等明确了施用于草坪土壤的木霉在较短时期内的定殖特性^[9]。

木霉 P3.9 菌株对枇杷根腐病菌具有极强的抑菌及重寄生作用,抗菌谱广^[10],且固体发酵条件简单^[11],对部分化学农药具有耐药性^[12],能定殖于枇杷各个器官及其根际土壤^[13]。为进一步明确木霉 P3.9 菌株在枇杷根际土壤中的施用持效期及最佳施用时期,本研究采用土壤稀释分离法与平板计数法,跟踪分析该菌株随时间延长在土壤中的定殖动态,以期为该菌株的进一步开发利用提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 内生木霉(*Trichoderma atroviride*) P3.9 菌株,分离自枇杷主干韧皮部,保存于红河学院生命科学与技术学院植物病理学标本室。1 年生枇杷嫁接苗,种植于直径为 23 cm、深为 18 cm 的营养袋中。

1.1.2 供试培养基 PDA 培养基:马铃薯 200 g、琼脂粉 20 g、葡萄糖 16 g。木霉选择性培养基: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, KCl 0.15 g, K_2HPO_4 0.9 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g, 葡萄糖 3.0 g, 玫瑰红[四氯四碘萤素钠盐($C_{20}H_2O_5Cl_4I_4Na_2$)] 0.033 g, 琼脂粉 20 g, 75% 五氯硝基苯可湿性粉剂 0.2 g, 蒸馏水 1 000 mL, 所用试剂为分析纯。配制好的培养基在 121 ℃ 下高压灭菌 30 min, 备用。

1.2 试验方法

1.2.1 木霉菌悬液的准备与根际土壤接种 将试管斜面保存的 P3.9 菌株移入 PDA 平板上活化,待菌落长满培养皿时,用打孔器取直径为 5 mm 的菌饼,接入新的 PDA 平板中央进行培养,共培养 5 皿,28 ℃ 下培养 5 ~ 7 d;待菌落长满全皿,收集所有培养物至粉碎机中,加入适量无菌水,充分打匀,制成

菌悬液,使孢子浓度为 1×10^6 CFU/mL, 备用;将孢子悬浮液浇灌于枇杷嫁接苗根际,500 mL/株,以浇灌等量清水作为对照。重复 10 次,常规肥水管理。

1.2.2 木霉定殖能力的测定 自浇灌木霉孢子悬浮液起 90 d 内,每隔 5 d 用高为 0.5 m、钻头直径为 38 mm 的不锈钢环刀土钻在枇杷嫁接苗根际取土样 1 次,采集深度为 5 ~ 15 cm,每处理随机取 5 株,每株采用 5 点取样法采集土样,并采用四分法充分混匀土样,备用;称取 1 g 土样置于装有 99 mL 无菌水的三角瓶中,在转速为 200 r/min 的振荡仪器上振荡 20 min,配制成 10^{-2} 土壤稀释悬浮液;静置 2 min 后,用无菌微量移液器吸取悬浮液 1 mL,加入到 9 mL 无菌水中混匀,即为 10^{-3} 土壤稀释悬浮液,如此重复,依次配制成 10^{-4} 、 10^{-5} 土壤稀释悬浮液;取 10^{-5} 土壤稀释悬浮液 50 μ L,采用倾注法加入木霉选择性平板培养基中,在 28 ℃ 恒温培养箱中培养 3 ~ 5 d,统计平板上直径 ≥ 10 mm、近圆形、扁平、呈放射状的无色透明或浅绿色单菌落数量,重复 5 次;计算土样中木霉种群密度,计算公式为

种群密度 = 每皿菌落平均值 \times 稀释倍数 $\times 20 \times$ 水分系数;

环比增长率 = (本期的木霉种群密度 - 上一期木霉种群密度) / 上一期木霉种群密度 $\times 100\%$;

同比增长率 = (本阶段木霉种群密度变化值 - 上一相同变化阶段木霉种群密度变化值) / 上一相同变化阶段木霉种群密度变化值 $\times 100\%$ 。

其中,环比增长率、同比增长率为正值时表示增长,为负值时表示下降。

1.3 数据统计

采用 Excel 2010 软件对试验数据进行汇总计算、作图,采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,采用 Duncan's 新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 木霉 P3.9 菌株施入枇杷根际土壤 5 ~ 90 d 期间的定殖动态

由图 1 可见,P3.9 菌株在枇杷根际土壤中的定殖过程大致可划分为 3 个阶段,第 1 阶段为前 25 d 内,菌株相对含量以 10 d 为 1 周期呈“增减增减”变化趋势,且于 10 d 时达到最大值,为 9.52×10^5 CFU/g,该时期木霉 P3.9 菌株在根际土壤中快速适应并定殖存活;第 2 阶段为 25 ~ 65 d 期间,P3.9 菌株相对含量的变化周期延长至 20 d,也呈

“增减增减”变化趋势,且波动幅度较5~25 d期间小,该时期木霉能够相对稳定地定殖存活于根际土壤中;第3阶段为65~90 d期间,P3.9菌株相对含量在施入土壤65~75 d期间出现小幅度增加后呈

近直线状下降态势,75 d时木霉相对含量为 1.11×10^5 CFU/g,较接入的初始木霉数量下降1个数量级,而至90 d时木霉相对数量达到最低值,为 4×10^3 CFU/g。

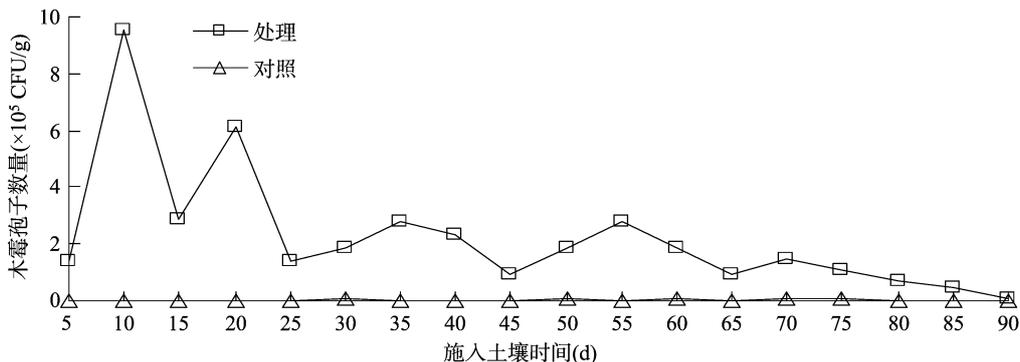


图1 木霉 P3.9 菌株施入枇杷根际土壤 5~90 d 期间的数量变化

2.2 木霉 P3.9 菌株施入枇杷根际土壤 3 个阶段的定殖动态分析

2.2.1 第1阶段 由表1、图2、图3可见,在5~25 d期间,枇杷根际土壤施入木霉 P3.9 菌株的处理,木霉相对含量(孢子数量)以10 d为1周期呈“增减增减”波动变化,且总体减少趋势,木霉施入土壤后前期相对含量迅速上升,10 d时达到最大值,此时木霉相对含量为 9.52×10^5 CFU/g,较接种5 d时环比增长575.18%,随后出现下降趋势,接种处理15 d时木霉相对含量较10 d时环比下降70.27%,之后又上升,接种处理20 d时菌体相对含量较15 d时环比上升116.96%,之后又下降,接种处理25 d时较接种20 d时环比下降76.71%;接种处理5~25 d内,每隔5 d测得的木霉相对含量相互间差异极显著($P < 0.01$),且10~25 d测得的木霉相对含量均高于最初检测值,表明该测试菌株施入土壤后前期定殖能力较强;木霉在枇杷根际土壤中的定殖共历经2个周期(5~15 d、15~25 d),第2个周期的波动幅度低于第1个周期,第2个周期增长阶

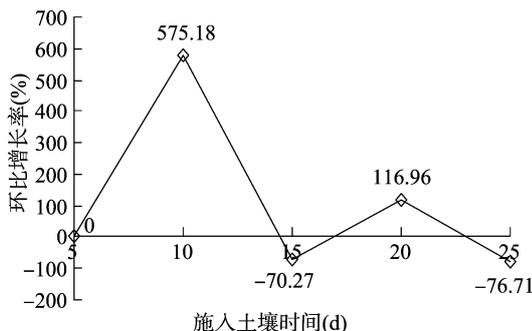


图2 施入枇杷根际土壤 5~25 d 期间木霉 P3.9 菌株的环比增长率变化

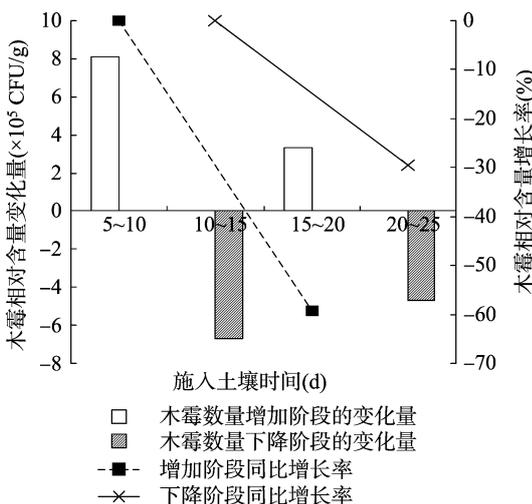


图3 木霉 P3.9 菌株施入枇杷根际土壤 5~25 d 期间 2 个周期相同变化阶段的同期比较

表1 木霉 P3.9 菌株施入枇杷根际土壤 5~25 d 期间的数量变化

施入土壤时间 (d)	木霉 P3.9 菌株相对含量 ($\times 10^5$ CFU/g)	
	接种	未接种
5	1.41eE	0.00aA
10	9.52aA	0.00aA
15	2.83cC	0.00aA
20	6.14bB	0.00aA
25	1.43dD	0.00aA

注:同列数据后不同大、小写字母表示处理间差异极显著($P < 0.01$)、显著($P < 0.05$)。下同。

段较第1个周期增长阶段同比下降59.19%。未接种的对照组没有观察到木霉菌落的出现。

2.2.2 第2阶段 由表2、图4、图5可见,在25~65 d期间,每隔5 d测得的土壤中木霉相对含量相互间存在极显著差异($P < 0.01$);未接种木霉的对

表2 木霉 P3.9 菌株施入枇杷根际土壤 25~65 d 期间的数量变化

施入土壤时间 (d)	木霉 P3.9 菌株孢子数量 ($\times 10^5$ CFU/g)	
	接种	未接种
25	1.43fF	0.00bB
30	1.86dD	0.05aA
35	2.76bB	0.00bB
40	2.30cC	0.00bB
45	0.91gG	0.00bB
50	1.86dD	0.05aA
55	2.78aA	0.00bB
60	1.83eE	0.05aA
65	0.91gG	0.00bB

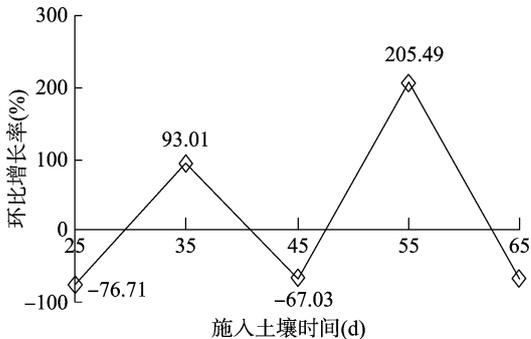


图4 施入枇杷根际土壤 25~65 d 期间木霉 P3.9 菌株的环比增长率变化

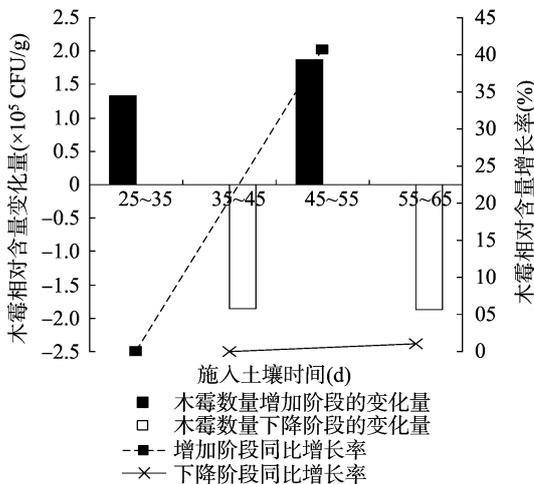


图5 木霉 P3.9 菌株施入枇杷根际土壤 25~65 d 期间 2 个周期相同变化阶段的同期比较

照组分别于 30、50、60 d 观察到极少量木霉,其他调查时间未观察到木霉菌落的出现。该阶段,木霉相对含量变化同样历经 2 个周期(25~45 d、45~65 d),时间间隔延长为 20 d,木霉相对含量分别于 25~35 d、45~55 d 呈上升趋势,35~45 d、55~65 d 呈下降态势,在第 1 个周期内,接种处理 35 d 时的菌体相对含量较 25 d 时环比上升 93.01%,45 d 时

的菌体相对含量较 35 d 时环比下降 67.03%;在第 2 个周期内,接种处理 55 d 时的菌体相对含量较 45 d 时环比上升 205.49%,65 d 时的菌体相对含量较 55 d 时环比下降 67.27%;第 2 个周期增长阶段较第 1 个周期增长阶段同比上升 40.60%,而下降阶段同比上升 1.08%,2 个周期的波动幅度相似且最值接近,说明该阶段测试菌株定殖存活能力的动态变化趋于相对稳定状态。

2.2.3 第 3 阶段 由表 3、图 6 可见,在 65~90 d 期间,随调查时间的延长,接种处理的木霉相对含量呈先增后减的变化趋势,没有明显的周期性变化规律,且菌株的定殖存活能力已处于整体测试阶段的最低水平,而未接种木霉的对照组分别于 70、75 d 时观测到有少量木霉出现,而其他调查时间均未发现;接种处理 70 d 时的木霉相对含量达到本阶段最大值,为 1.45×10^5 CFU/g,较 65 d 时环比上升 59.34%,而 75 d 时的木霉相对含量较 70 d 时环比下降 23.45%;接种处理 75 d 后菌体相对含量呈近直线下降趋势,90 d 时达到最低值,仅为 4.00×10^3 CFU/g,此时若无外力干预,该菌株在施用土壤中可能无法继续存活并发挥生防作用。

表3 木霉 P3.9 菌株施入枇杷根际土壤 65~90 d 期间的数量变化

施入土壤时间 (d)	木霉 P3.9 菌株相对含量 ($\times 10^5$ CFU/g)	
	接种	未接种
65	0.91cC	0.00cC
70	1.45aA	0.05bB
75	1.11bB	0.09aA
80	0.66dD	0.00cC
85	0.49eE	0.00cC
90	0.04fF	0.00cC

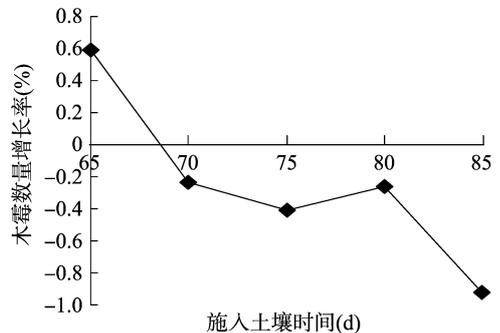


图6 施入枇杷根际土壤 65~90 d 期间木霉 P3.9 菌株的环比增长率变化

3 结论与讨论

有研究表明,生防菌的快速定殖能力是提高其

对土传病害防治效果的重要因素之一^[14]。许传坤等研究表明,木霉的萌发会受到土壤抑真菌作用的抑制^[15]。贺字典等研究发现,某些木霉在施入土壤后会历经一个适应过程,一旦适应后其定殖数量会迅速上升^[16]。康萍芝等发现,在施入土壤的较短时期内,木霉数量会迅速到达峰值,之后随着时间延长而逐渐呈下降趋势^[17]。本研究发现,木霉 P3.9 菌株在施入土壤的最初 10 d 内,相对含量呈指数形增长,接种 10 d 时达到最大值,随后开始回落,并以 10 d 为 1 个周期呈“增减增减”变化趋势,且增减幅度相对较大,而自接种处理 25 d 开始,呈以 20 d 为周期的“增减增减”变化趋势,增减幅度减小,说明木霉 P3.9 菌株在历经较短适应期后快速定殖于施用土壤中。

古丽君等研究发现,深绿木霉接种于土壤后,前期存在大量孢子,随着调查时间的延长,孢子数量呈先逐渐下降、再略有上升、后保持相对稳定的变化趋势,稳定时木霉在土壤中的相对含量为 10^4 CFU/g^[9]。徐瑞富等研究发现,木霉在未灭菌耕作层、亚表层中的定殖变化趋势呈先增后减、波浪状生长曲线^[18]。Orr 等研究表明,将 1 株木霉菌株存放在持续保湿的环境中,3 d 后菌落数量变化与时间的增加呈正相关关系,保存时间延长到 5 d 后,随保存环境的改变,菌株含量呈下降趋势^[19]。本研究结果表明,内生木霉 P3.9 菌株接种处理 75 d 时的相对含量虽较接入时的初始菌量下降近 1 个数量级,但土壤中该菌体相对含量仍能稳定在 10^5 CFU/g,说明木霉 P3.9 菌株相对含量相对稳定,持续期约为 75 d,优于古丽君等研究报道的菌株^[9,20],这可为其进一步开发利用提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1]潘玮,穆常青,蒋细良,等.木霉的孢子与土壤抑菌作用[J].中国生物防治,2006,22(2):87-91.
- [2]于新,田淑慧,徐文兴,等.木霉菌生防作用的生化机制研究进展[J].中山大学学报(自然科学版),2005,44(2):86-90.
- [3]徐文,黄媛媛,黄亚丽,等.木霉-植物互作机制的研究进展[J].中国生物防治学报,2017,33(3):408-414.
- [4]辛鑫.绿色木霉 H6-14 在土壤中定殖能力及对香蕉枯萎病原菌的抑制作用[D].海口:海南大学,2013.
- [5]杨力凡.深绿木霉 *Trichoderma atroviride* 生物菌肥的研制及对油菜菌核病、根肿病的生物防治[D].雅安:四川农业大学,2010.
- [6]Weller D M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria[J]. Annual Review of Phytopathology, 1988,26(1):379-407.
- [7]杜娟娟,付岗,潘连富,等.哈茨木霉 gz-2 菌株在土壤中的定殖规律研究[J].西南农业学报,2016,29(1):138-142.
- [8]肖荣凤,刘波,史怀,等.生防菌哈茨木霉 FJAT-9040 的 GFP 标记及土壤定殖示踪[J].植物保护学报,2011,38(6):506-512.
- [9]古丽君,徐秉良,梁巧兰,等.生防木霉对草坪土壤微生物区系的影响及定殖能力研究[J].草业学报,2013,22(3):321-326.
- [10]鲁海菊,张建春,杞敬香,等.枇杷内生木霉 P3.9 菌株抗菌谱研究[J].北方园艺,2014(24):103-107.
- [11]鲁海菊,张晓永,江涛,等.抗枇杷根腐病病菌的枇杷内生木霉 P3.9 菌株生物学特性[J].江苏农业科学,2018,46(2):53-57.
- [12]鲁海菊,王波,潘柳君,等.深绿木霉 P3.9 生防菌株固体发酵条件优化筛选[J].北方园艺,2014(14):119-123.
- [13]鲁海菊,沈云玫,陶宏征,等.内生木霉 P3.9 菌株的多功能性及其枇杷根腐病的盆栽防效[J].西北农业学报,2017,26(11):1681-1688.
- [14]贺字典,吴素霞,宋晓飞,等.生防菌与茄病镰刀菌在黄瓜根际动态变化[J].中国生物防治学报,2016,32(3):357-364.
- [15]许传坤,莫明和,张克勤.土壤对木霉生防菌株的抑制作用及这种作用的解除[J].南京师大学报(自然科学版),2004,27(2):77-80.
- [16]贺字典,宋士清,高玉峰,等.棘孢木霉 *Trichoderma asperellum* 在土壤中定殖量的荧光定量 PCR 检测[J].植物保护学报,2016,43(4):552-558.
- [17]康萍芝,张丽荣,沈瑞清,等.哈茨木霉制剂对设施连作番茄根际土壤微生物的生态效应及防病作用[J].农药,2013,52(2):128-131.
- [18]徐瑞富,陆宁海,张定法,等.土壤不同微生物量对木霉菌定殖的影响和木霉菌生态学习性研究[J].中国生态农业学报,2007,15(1):207-208.
- [19]Orr K A, Knudsen G R. Use of green fluorescent protein and image analysis to quantify proliferation of *Trichoderma harzianum* in nonsterile soil[J]. Phytopathology, 2004, 94(12):1383-1389.
- [20]鲁海菊,刘云龙.哈茨木霉强根际定殖能力菌株的筛选[J].中国生物防治,2008,24(2):138-142.